



MEASUREMENT OF HDL-CHOLESTEROL AND MEASUREMENT REAGENT

Patent number: JP9285298
Publication date: 1997-11-04
Inventor: FUJII TAKAYUKI; TSUBOTA HIROYUKI; HAMA MICHIO; KAZAHAYA KENJI; TSUCHIYA HOZUMI
Applicant: IATRON LAB
Classification:
- international: C12Q1/60; G01N33/92
- european:
Application number: JP19960122825 19960422
Priority number(s): JP19960122825 19960422

Report a data error here

Abstract of JP9285298

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure a HDL-cholesterol in a specimen such as serum and plasma by a simple operation by treating the specimen with cholesterol esterase, cholesterol oxidase, etc., in the presence of an albumin separately from one derived from the specimen. **SOLUTION:** In this method for measuring a high-density lipoprotein(HDL) in a specimen by treating the specimen containing HDL with a polyanion such as a sulfated polysaccharide, a bivalent metal salt, a nonionic surfactant such as n-octyl- β -glucoside, cholesterol esterase, cholesterol oxidase or cholesterol dehydrogenase and detecting a substance to be consumed or formed, an enzyme reaction is carried out by adding an albumin different from one derived from the specimen to the reaction system to measure HDL-cholesterol in the serum or plasma specimen by a simple operation without a centrifuging operation.

.....
Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-285298

(43)公開日 平成9年(1997)11月4日

(51)Int. Cl.⁶

C 1 2 Q 1/60

G 0 1 N 33/92

識別記号

庁内整理番号

7823-4 B

F I

C 1 2 Q 1/60

G 0 1 N 33/92

技術表示箇所

A

審査請求 未請求 請求項の数7

F D

(全8頁)

(21)出願番号 特願平8-122825

(22)出願日 平成8年(1996)4月22日

(71)出願人 000138277

株式会社ヤトロン

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

(72)発明者 藤井 隆行

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式
会社ヤトロン内

(72)発明者 坪田 博幸

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式
会社ヤトロン内

(72)発明者 濱 三知夫

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式
会社ヤトロン内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】HDL-コレステロールの測定方法及び測定用試薬

(57)【要約】

【課題】 血清または血漿試料中の高密度リポ蛋白 (HDL)-コレステロールを、遠心操作を行うことなく、簡便な操作で測定が可能な方法を提供する。

【解決手段】 少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白

(HDL)-コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行う。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とするHDL-コレステロールの測定方法。

【請求項2】 HDLを含有する試料に、ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ消費される物質または生成する物質を検出し試料中のHDL-コレステロールを測定する方法において、前記反応系に試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とする請求項1に記載のHDL-コレステロールの測定方法。

【請求項3】 ポリアニオンが硫酸化多糖類であり、非イオン性界面活性剤がn-オクチル-β-グルコシド、n-オクチル-β-チオグルコシド、n-ヘプチル-β-チオグルコシドから選択される1種以上である請求項2に記載のHDL-コレステロールの測定方法。

【請求項4】 少なくともコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールを測定するための試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とするHDL-コレステロールの測定用試薬。

【請求項5】 ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、消費される物質又は生成する物質を検出するための組成物からなるHDL-コレステロールの測定用試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とする請求項4に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

【請求項6】 ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤を含有する第一試薬と、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを含有する第二試薬とからなり、アルブミンを第一試薬に共存させることを特徴とする請求項5に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

【請求項7】 ポリアニオンが硫酸化多糖類であり、非イオン性界面活性剤がn-オクチル-β-グルコシド、n-オクチル-β-チオグルコシド、n-ヘプチル-β-チオグルコシドから選択される1種以上である請求項5、6に記載のHDL-コレステロールの測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールの測定方法およびHDL-コレステロールの測定用試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 血漿又は血清中の各リポフラクション中に含有されるコレステロールは、近年アテローム性動脈硬化症や心筋梗塞の危険度を示す診断材料として重要視されている。血清のリポフラクションはそれぞれ脂質複合体粒子としての大きさが異なり、比重の差を利用した分離法である超遠心法に従って、カイロミクロン、超低密度リポ蛋白(Very low density lipoprotein; 以下VLDLともいう)、低密度リポ蛋白(Low density lipoprotein; 以下LDLともいう)、及び高密度リポ蛋白(High density lipoprotein; 以下HDLともいう)の4種類に分別されている。各リポフラクションは、アポリポタンパク質と脂質に大別され、脂質は更に遊離型コレステロール、エステル型コレステロール、トリグリセリド及びリン脂質から構成されている。このため、コレステロールの測定は遊離型とエステル型の両者について行われている。

【0003】 日常的な臨床検査では、自動分析装置を使用して酵素法による総コレステロールの測定が広く行われているが、HDL-コレステロールの測定については、試料の前処理(分画・分離操作)を行うことが必要なため、酵素法による自動分析測定(自動化)の普及が遅れていた。この試料の前処理としては、種々の沈殿法が行われており、例えばリタングステン酸とマグネシウムイオン、デキストラン硫酸とマグネシウムイオン、ヘパリンとカルシウムイオンあるいはマンガンイオン(M. Burstein and H. R. Scholnick; Adv. Lipid Res., 11, 67, 1973, G.R. Warnick et al.; Clin. Chem., 25, 596, 1979)、又はポリエチレングリコールを添加してLDL等を沈殿させて遠心操作によって上澄み液を被検試料とする方法が繁用されている。詳細には、沈殿剤としてリタングステン酸とマグネシウムイオンを使った場合、これらを含有する溶液に試料(血清や血漿)を加え、HDL以外のリポフラクションを不溶性の複合体とする。これを遠心分離することによって沈殿を除き、HDLを含む上清を回収する。分画されたHDLは総コレステロール測定用の酵素試薬で自動分析システムによる測定が可能となる。また、免疫法(C-C. Heuck, et al. Clin. Chem. 31, 252, 1985)においても沈殿剤としてアポリポタンパク質B(HDLには含まれない)に対する抗体を試料(血清や血漿)に加え、HDL以外のリポフラクションを沈殿させる。以下同様に分画した後、はじめて上清中のHDL-コレステロールの測定を行うことができる。このように、従来の方法ではいずれも多く工程と時間を要するという欠点があった。

【0004】 最近、これら分画操作を必要としない測定法について報告が出されている(例えば、特公平6-1

6720号、特公平7-34760号、特開昭58-165800号各公報、国際出願番号PCT/JP95/00378)。すなわち、従来より主に用いられている総コレステロール測定のための酵素法としては、コレステロールエステラーゼによりコレステロールエステルを加水分解し、この酵素反応生成物であるコレステロールをコレステロールオキシダーゼにより、溶存酸素を使って酸化反応を行わせて生成される過酸化水素を、適当な被酸化性発色剤の存在下でペルオキシダーゼ反応により発色させて比色定量したり、あるいは、前記のコレステロールオキシダーゼによる酸化反応の際に消費される溶存酸素量を酸素電極で測定する方法が知られていた。

【0005】例えば、前記の各特許公報の記載によれば、前記の反応系において胆汁酸塩と共に非イオン系のポリエチレンオキシド基含有界面活性剤の存在はコレステロールエステラーゼの活性発現に重要であり、この界面活性剤なしには活性を発現しないとされている。そして、特公平6-16720号公報には、この胆汁酸塩には、脂質が豊富で比較的わずかなタンパク質を有するリポタンパク質である乳び脂粒、VLDL及びLDLのみを溶かし、その中に含有されるコレステロールを酵素反応に関与させる効果があるため、HDL-コレステロールの測定にさきがけて、これを反応させ、次いで前記の界面活性剤を添加し、HDLフラクション中に有されるコレステロールと酵素とを反応させることによってHDL-コレステロールを特異的に分別測定する方法が記載されている。また、特公平7-34760号公報には、前記と同様の系において、更に、使用する酵素を脾臓由来のコレステロールエステラーゼとし、抗LDL抗体を反応系へ添加しておくことにより、LDLやVLDLの主要構成タンパク質であるアポリタンパク質Bと前記抗体との間に抗原抗体反応による複合体を形成させ、当該酵素との反応を阻害することで総合的にHDLフラクションに対する特異性を上げる工夫を行っている。

【0006】また、国際出願番号PCT/JP95/00378は高密度リポ蛋白(HDL)以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下、HDLを含有する試料に化学修飾されたコレステロールエステラーゼ、化学修飾されたコレステロールオキシダーゼまたは化学修飾されたコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、生成する過酸化水素または還元型補酵素を定量することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法が記載されている。

【0007】また、H. Sugiuchiらは国際出願番号PCT/JP95/00378を応用し自動分析機へ適応した新しい方法について報告している(Clin. Chem., 41, 717, 1995)。すなわち、使用する当該酵素(コレステロールエステラーゼ、及びコレステロールオキシダーゼ)にポリエチレングリコールを結合させ、化学修飾して高分子化した酵素を用いるものである。更

に、前記の高分子化酵素に加えて、種々のリビドフラクションと親和性があるとされるシクロデキストリン誘導体(具体的には、硫酸化 α -シクロデキストリン)を共存させることでHDL以外のリビドフラクションに対して複合体を形成させることができることが記載されている。この複合体は、前記高分子化酵素による反応を受けにくいためHDLフラクションを特異的に測定することができる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上述の従来方法では、試薬へ新たに抗体を添加したり、反応時間が20分以上かかるなど、製造コストや測定操作上、日常使われている自動分析機への対応が不十分であったり、化学修飾した酵素を利用するには、酵素の修飾という新たな工程の増加と、酵素標品の精製度の管理や化学修飾の程度差による酵素活性変動の抑制と管理、更には修飾酵素の安定性の維持等、新たな問題点を付随することになる。また、界面活性剤のみの使用による分別では不完全さが否めない。本発明者等は、現在の臨床検査試験では、迅速で簡便な手段である自動分析装置による測定が主流である点を鑑み、従来のHDL-コレステロールの測定方法及び測定用試薬において、試料(血清又は血漿)の遠心操作を行うことなく簡便な操作で、且つ高精度の測定結果が得られる方法の開発を目的として、鋭意研究を重ねた結果本発明を完成させた。

【0009】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールを測定する方法において、試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加・存在させて前記酵素反応を行うことを特徴とするHDL-コレステロールの測定方法、に関する。更に、本発明は、少なくともコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させて試料中の高密度リポ蛋白(HDL)-コレステロールを測定するための試薬において、更にアルブミンを共存させることを特徴とするHDL-コレステロールの測定用試薬、にも関する。以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】本発明の特徴は、従来のHDL-コレステロールの測定方法において、血清や血漿等の生体液試料に由来するアルブミンとは別に、人為的にアルブミンを反応系に存在させると、HDL-コレステロールの測定方法において使用する酵素(コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ)とリビドフラクション含有コレステロールとの反応に関して、アルブミンがHDL-コレステロールとの反応には影響しないが、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの反応を阻害すると

いう新知見を基本とする。

【0011】本発明において、試料としては、特に哺乳動物（特にヒト）の生体液であり、具体的には血清又は血漿をそのまま用いることができる。本発明においては、前記の生体試料をコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際に、試料由来のアルブミンとは別に人為的にアルブミンを存在させることで、前記酵素とLDLコレステロール及びVLDLコレステロールとの反応を阻害させた後、係るHDLコレステロール測定の実施すれば良い。

【0012】以下の記述において、「HDL以外のリポ蛋白を凝集させる」とは、HDL以外のリポ蛋白と凝集試薬が会合状態を呈し、該リポ蛋白と酵素との反応が阻害される状態をいう。HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDLコレステロールを測定する反応系、具体的には、HDL以外のリポ蛋白であるLDL、VLDLおよびカイロミクロンを凝集させる凝集試薬、すなわちポリアニオンと2価の金属塩からなる凝集試薬、具体的には、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩もしくはこれらの組み合わせ及び2価の金属塩からなる公知の凝集試薬を用いるHDLコレステロールの測定に本発明方法を適用する場合、試料とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際に、アルブミンを共存させておく。あるいは、試料とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと接触させる際、予めアルブミンを共存させておき、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの反応を阻害し、LDL及びVLDLフラクションの反応を完全に停止することが可能となり、精度良くHDLフラクションのコレステロールだけを選択的に測定することができる。

【0013】アルブミンは、本来血清（血漿）にも含まれているため、本反応系には試料由来のアルブミンが微量存在する。しかし、HDL以外のリポ蛋白とコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼの反応を阻害するためには、試料由来のアルブミンでは不充分であることは以下の実施例で確認されている。反応系におけるアルブミン量は、0.01～20.0重量%、好ましくは0.1～20.0重量%、より好ましくは0.5～10.0重量%のアルブミンを存在させておくことが必須であり、この範囲内にコントロールするために試料由来のアルブミンとは別異にアルブミンを添加することが必要となる。

【0014】HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDLコレステロールを測定する反応系の場合、遠心分離等

の操作を行わずに、アルブミン、ポリアニオン、2価の金属塩、非イオン性界面活性剤と試料を接触させることにより、被検試料中のLDLコレステロール及びVLDLコレステロールと酵素とは反応しないが、HDLコレステロールと酵素と反応するようになる。次いでコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、HDLコレステロールのみと前記各酵素との酵素反応により消費される物質（例えば、補酵素）又は生成される物質（例えば、過酸化水素）を、公知の手段により検出し、HDLコレステロールを定量することができる。例えば、過酸化水素を検出する場合には、適当な被酸化性発色剤とペルオキシダーゼの存在下に生成する過酸化水素を発色させて、分光学的に比色測定すれば良い。また、コレステロールデヒドロゲナーゼを用いる場合、NAD(P)から生成するNAD(P)Hを例えば波長340nmで分光学的にモニターすることで検出することができる。

【0015】過酸化水素は、公知の方法で、例えば、適当な被酸化性発色剤の存在下にペルオキシダーゼの反応により発色させることができる。被酸化性発色剤としては、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨードベンゾイックアシッド(HTIBA)やN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(ESPT)と4-アミノアンチピリン(4-AP)が好適であり、自動分析装置による測定では、波長510nm(HTIBAを使用する場合)付近、又は546nm(ESPTを使用する場合)付近における吸光度を測定すればよい。

【0016】次に、従来のHDLコレステロール測定用試薬にアルブミンを共存させた試薬について説明する。原則としてコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させてHDLコレステロールを測定する試薬であれば本発明は適用可能である。具体的には、例えばHDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDLコレステロールを測定する試薬においては、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる凝集試薬、すなわちポリアニオンと2価の金属塩からなる凝集試薬、具体的には、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩もしくはこれらの組み合わせ及び2価の金属塩からなる凝集試薬、更に非イオン性界面活性剤、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、酵素反応によって消費される物質（例えば、補酵素）又は生成される物質（例えば、過酸化水素）を検出するための組成物に、アルブミンを存在させたものであれば良い。

【0017】アルブミンとしては、反応系に0.01～20.0重量%、好ましくは0.1～20.0重量%、より好ましくは0.5～10.0重量%となるように試

葉中に含有させる。アルブミン濃度が0.01重量%より少ないと阻害効果が不十分であり、10.0重量%を越えると試薬の粘度が高くなり、測定の再現性の悪化を招くという問題点が生じる。また、アルブミンの由来は特に限定されず、ヒト、ウシ、ヒツジ、ウマ等の哺乳動物由来のほか遺伝子工学的に産生されたものでも使用できる。上記試薬の場合、アルブミンと併用するポリアニオンとしては、硫酸化多糖類が好ましく、特にデキストラン硫酸がHDL以外のリポ蛋白と酵素との反応を効果的に阻害するため、デキストラン硫酸を使用することが好ましい。デキストラン硫酸としては、反応系に1 μ M~50.0 μ M、好ましくは5.0 μ M~100 μ Mの分子量10000~500000のデキストラン硫酸またはその塩、あるいは10 μ M~5mM、好ましくは50 μ M~1mMの分子量1000~10000のデキストラン硫酸またはその塩となるように試薬中に含有させる。デキストラン硫酸濃度が下限より少ないと阻害効果が不十分であり、上限を越えると酵素の阻害による反応性低下という問題点が生じる。2価の金属塩としてはマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩であり、塩としては、水溶性無機塩、例えば、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、又はヨウ化物）又は硫酸化物、あるいは、水溶性有機塩、例えば、酢酸塩又はクエン酸塩として用いることができる。2価の金属としては、反応系に1~100mM、好ましくは5~50mMの濃度となるように試薬中に含有させる。2価の金属塩の濃度が下限より少ないと阻害効果が不十分であり、上限を越えると保存による金属の塩析や酵素の阻害による反応性低下という問題点が生じる。

【0018】非イオン性界面活性剤としては、公知の非イオン性界面活性剤全般を使用することができるが、上記試薬の場合、アルブミンと併用する非イオン性界面活性剤としては特にn-オクチル- β -グルコシド、n-オクチル- β -チオグルコシド、n-ヘプチル- β -チオグルコシドがHDL以外のリポ蛋白と酵素との反応を好適に阻害するため、これらから選択される1種以上のものを使用することが好ましい。その反応系における濃度がn-オクチル- β -グルコシドの場合、0.01~2.0%、好ましくは0.1~1.0%となるように試薬中に含ませる。n-オクチル- β -チオグルコシドの場合、0.01~1.0%、好ましくは0.05~0.5%で用いる。n-ヘプチル- β -チオグルコシドの場合、0.01~2.0%、好ましくは0.1~1.0%で用いる。あるいは、これらを前記濃度範囲内で混合して使用しても良い。前記非イオン性界面活性剤の濃度が下限より少ないと酵素との反応が不十分となり、上限を越えるとHDL-コレステロールに対する阻害効果が低下するという問題点が生じる。

【0019】コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼ等の酵素としては、ポリエチレン

リコール(PEG)等を結合させて化学修飾した酵素、又は化学修飾していない酵素のいずれも用いることができる。酵素の由来も限定されず、コレステロールエステラーゼとしては、例えば、シュードモナス属の微生物や、牛又は豚の膵臓由来のコレステロールエステラーゼを用いることができる。また、コレステロールオキシダーゼとしては、例えば、ストレプトマイセス属又はノカルディヤ属の微生物由来のコレステロールオキシダーゼを用いることができる。コレステロールデヒドロゲナーゼについても同様であり、例えば、微生物由来のものを使用することができる。それらの酵素の添加量も特に限定されないが、例えば、0.1u/ml~20u/ml、より好ましくは0.2u/ml~10u/mlである。

【0020】コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、HDL-コレステロールのみと前記各酵素との酵素反応により消費される物質（例えば、補酵素）又は生成される物質（例えば、過酸化水素）を検出するには、公知の組成物を用いれば良い。例えば、過酸化水素を検出する場合には、適当な被酸化性発色剤とペルオキシダーゼの存在下に生成する過酸化水素を発色させて、分光学的に比色測定ができ、例えば、適当な被酸化性発色剤の存在下にペルオキシダーゼの反応により発色させることができる。被酸化性発色剤としては、3-ハイドロキシ-2,4,6-トリヨードベンゾイックアシッド(HTIBA)やN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(ESPT)と4-アミノアンチピリン(4-AP)が好適であり、HTIBAやESPTは0.1mM~5mMの濃度範囲で、そして4-APは0.05mM~2mMの濃度範囲で適宜含有させることができる。

【0021】本発明のHDL-コレステロール測定用試薬は、現在汎用されている自動分析装置に合わせて、2試薬系にすることができる。この場合、第一試薬にアルブミン、ポリアニオン（例えば、デキストラン硫酸）、2価金属塩、非イオン性界面活性剤を含有させ、第二試薬にコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを含有させる。第一試薬及び第二試薬の緩衝剤としては、リン酸緩衝液、BES、HEPES、PIPESなどのグッド緩衝液、トリス緩衝液、イミダゾール緩衝液等を使用することができる。緩衝液の濃度としては、10~1000mM、好ましくは20~500mMである。また、それらの緩衝液のpHは、5.0~9.0、好ましくはLDLのコレステロール及びVLDLのコレステロールと酵素との阻害が良好なpH6.0~8.0の範囲内で適宜選択することができる。

【0022】2試薬系の本発明試薬を用いて、HDL-コレステロールを測定する場合の反応系を模式的に示せ

ば以下のとおりである。

第一試薬 (アルブミン、ポリアニオン、2価金属塩、非イオン性界面活性剤)

+被検試料 (血清/血漿)

↓ LDL, VLDL と酵素の反応阻害化

第二試薬 (酵素及び発色系構成成分含有)

(コレステロールエステラーゼ反応)

コレステロールエステル + $H_2O \rightarrow$ コレステロール + 脂肪酸 (1)

(コレステロールオキシダーゼ反応)

コレステロール + $O_2 \rightarrow \Delta 4$ -コレステレン-3-オン + H_2O_2 (2)

(ペルオキシダーゼ反応)

H_2O_2 + 被酸化性発色剤 \rightarrow 酸化縮合物 (3)

↓

吸光度測定

【0023】自動分析装置による測定では、主に前記反応式 (2) で生成する過酸化水素を比色法によって測定するが、これら溶液中での反応だけでなく、例えば、濾紙試験片などによる乾式測定系 (ドライケミストリー) でも同様に用いることができる。また、過酸化水素は、フェロシアン化カリウムなどの適当なメディエーターとペルオキシダーゼの存在下に反応させることにより、生成する酸化電位差を電気化学的に測定することもできる。他方、酵素反応により消費される物質、例えば、前記反応式 (2) で消費される酸素 (溶存酸素) を、従来公知の方法、例えば、酸素電極で測定することもできる。また、酵素反応により生成される化合物としては、前記の過酸化水素以外にも、例えば、前記反応式 (1) の生成物である脂肪酸、あるいは前記反応式 (2) の生成物である $\Delta 4$ -コレステレン-3-オンを適当な方法で測定してもよい。

【0024】

【作用】以下の説明に限定されるものではないが、本発明においては、HDL-コレステロールの測定方法において利用する酵素 (コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ) とリポドフラクション含有コレステロールとの反応に際して、前記従来の凝集試薬として用いる化合物が、直接にリポドフラクションのアポリポタンパク質に親和性を示すか、あるいは間接的にリポドフラクションのコレステロールと酵素との反応時に酵素と相互作用するものと考えられる。すなわち、各リポドフラクションは、脂質とアポリポタンパク質とからなる脂質複合体となっているが、その脂質構成比の違いとアポリポタンパク質のタイプ (A-1, A-1, B-100, B-48, C, E など) の差による物理化学的性質及び量的 (被検試料中に含まれる量) な違いによって識別される。HDLフラクションとLDL及びVLDLフラクションとの間で最も大きく異なるアポリポタンパク質のタイプ (前者がA-1, A-2、後者がB-100, C, E) の違いが明らかなため、従来、アポリポタンパク質に対する抗体を用いる方法も開発されてきた。この従来

法はアポリポタンパク質B及びCに対する抗体を試料に混和し、免疫複合体を形成させることが特徴である。この免疫複合体は酵素反応阻害を惹起するため、次に酵素を加えるとHDL-コレステロールのみが酵素と反応するので、HDL-コレステロールのみを測定することができる。しかし、免疫複合体を形成することができる抗体の反応性を一定に維持することは難しく、また免疫複合体自体の濁りが著しいため、コレステロール測定のための比色定量に際して誤差が大きくなるという欠点があった。

【0025】これに対し、本発明では、アルブミンの添加によって前記従来の凝集試薬がアポリポタンパク質を中心とする脂質複合体と相互に作用し、酵素の化学修飾等も必要とせず、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼによる、各リポドフラクションのコレステロールに対する反応性を特異的に変化させることができ、しかも、本発明方法は、抗体とは異なり、安定な化合物であり、さらに酵素の修飾に伴う新たな工程の増加と、酵素標品の精製度の管理や化学修飾の程度差による酵素活性変動の抑制と管理、更には修飾酵素の安定性の維持等、新たな問題点について考慮する必要がない。

【0024】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1: 超遠心法によるリポドフラクションの分画
超遠心法による脂質フラクションの分画は、工藤明生等 (動脈硬化、6, 39, 1978) の方法に準じて行った。具体的には、プール血清16mlへ、EDTAナトリウム塩16mg、ショ糖4g、臭化カリウム3.2g、及び塩化ナトリウム0.8gを加え溶解した。これとは別に3種類の比重液を作成した。すなわち、比重1.21の比重液は、ショ糖20g、臭化カリウム15g、及び塩化ナトリウム5gを精製水100mlに溶解して調製した。比重1.063の比重液は、比重1.21の前記比重液30mlと精製水70mlを混和して調製した。ま

た比重1.006の比重液は、ショ糖2.5gを精製水97.5mlに溶解して調製した。10ml容量の遠心管に上記の血清1.9mlを入れ、この上層に比重1.21の比重液0.8mlを注射器で静かに重層し、遠心管を10℃で5000rpm20時間遠心した。遠心処理終了後、最上層部には比重1.21以下の全てのリポドフラクションが集まるが、この最上層部の上に更に比重1.063の比重液1.6mlと比重1.006の比重液2mlとを重層した。この遠心管を5000rpmで4時間更に遠心し、各リポドフラクションを回収した。各画分は生理的食塩水に一夜透析後（冷蔵下）、冷蔵保存した。

【0025】実施例2：反応阻害剤の検索例

表1に示す各ポリアニオンを含む水溶液0.6mlと、100mMの塩化マグネシウム、1.0%のn-OTG及び5mMのESPTを含む250mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.15ml、試料として実施例1で得られたリポドフラクションのうち、HDLの20 μ l、LDLの10 μ l、VLDLの10 μ lを各々混合し、37℃で5分間加温した。これに0.5mMの4-AP、20 μ g/mlのPOD、各5u/mlのCHE（シュードモナス由来）及びCHO（ノカルディア由来）を含む50mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.25mlを混合攪拌し、37℃で5分間反応させ*

させた後、波長546nmにおける吸光度を測定した。また、各ポリアニオン含有水溶液にアルブミンを表2に示した濃度で添加したものを同じ同様の操作を行った。別に、ポリアニオン及びアルブミンを含まない精製水を用いて、前記と同様の操作を行い吸光度を測定した。ポリアニオン及びアルブミンを含まない時の吸光度を100として、各ポリアニオン、各ポリアニオンにアルブミンを添加したものを同様の操作を行ったときの吸光度の低下率を各脂質フラクションに対する反応阻害率として求めた。結果を表1、表2に示す。なお、各物質の略号は以下の意味である。

DS：デキストラン硫酸

ALB：血清アルブミン。

P：リンタングステン酸ナトリウム

HP：ヘパリンナトリウム

PEG：ポリエチレングリコール

n-OTG：n-オクチル- β -D-チオグルコシド

CHE：コレステロールエステラーゼ

CHO：コレステロールオキシダーゼ

POD：ペルオキシダーゼ

ESPT：N-エチル-N-スルホプロピル-m-トリジン

【0026】

【表1】

ポリアニオン	濃度	HDL阻害率	LDL阻害率	VLDL阻害率
DS	0.5mM	2%	64%	31%
P	0.5mM	1%	28%	18%
HP	50U/ml	1%	35%	24%
PEG	0.5mM	0%	5%	3%

【0027】

※30※【表2】

ポリアニオン	濃度	アルブミン (%)	HDL阻害率	LDL阻害率	VLDL阻害率
DS	0.5mM	2%	4%	97%	98%
P	0.5mM	2%	2%	44%	64%
HP	50U/ml	2%	3%	56%	34%
PEG	0.5mM	2%	1%	9%	7%
DS	0.5mM	0.02%	2%	67%	45%
DS	0.5mM	0.1%	2%	78%	57%
DS	0.5mM	0.2%	2%	81%	68%
DS	0.5mM	1%	2%	92%	90%
DS	0.5mM	10%	5%	94%	95%
HP	0.5mM	5%	4%	65%	57%

【0028】表1、表2の結果より、HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDL-コレステロールを測定する反応系において、一定量以上のALBの添加によってLDL及びVLDLを十分阻害していることがわかる。特にALBとDSとの組み合わせが効果的であった。これにより、HDLフラクションのコレステロールを精度良く正確に測定することができる。

【0029】実施例3：反応経時変化

0.5mMのDS、2.0%のALB、20mMの塩化

マグネシウム、0.2%のn-OTG及び1mMのESPTを含む50mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.75mlに、試料として、血清10 μ lを加え、37℃で5分間加温した。これに0.5mMの4-AP、20 μ g/mlのPOD、各5u/mlのCHE及びCHOを含む50mMのビスートリス緩衝液（pH7.0）0.25mlを添加し、37℃で5分間加温した後の波長546nmでの吸光度変化を測定した。血清に換えてHDL-コレステロール標準品について同様の

操作を行い、血清中のHDL-コレステロール値を求めた。また、ALBを除いたものを用いて同様の操作を行い対照とした。他方、同じ検体についてゲルろ過カラムによる反応液体クロマトグラフィー法（HPLC法、W, Marz等, Clin. Chem., 39; 2276, 1993）での測定を実施し、その測定値と比較した。また、各測定法*

*での標準物質としては、予め超遠心法で分画したHDLフラクションの総コレステロール値を酵素法で測定したものを用いた。血清10例の測定値を表3に示す。

【0030】

【表3】

検体	本法	対照法	HPLC法
血清1	38.2	60.5	37.8
血清2	41.3	58.6	40.3
血清3	36.2	75.6	36.2
血清4	16.5	30.1	17.4
血清5	29.2	42.3	28.5
血清6	21.4	58.4	23.7
血清7	32.6	75.1	32.4
血清8	27.9	31.2	26.5
血清9	70.1	109.9	68.9
血清10	43.7	46.2	41.6

単位：mg/dl

【0031】表3の通り、本発明方法は対照法と比較して、HPLC法との相関が良く、血清中のHDL-コレステロールを正確に測定することができる。

【0032】

※

※【発明の効果】試料（血清又は血漿）の遠心操作を行うことなく、簡便な操作で、HDL-コレステロールの高精度な測定を行うことができる。

フロントページの続き

(72)発明者 風早 健司
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内

(72)発明者 土屋 はずみ
東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株式会社ヤトロン内